

暗所閾値電位の新しい記録方法の創案

金沢大学医学部眼科学講座 (主任:河崎一夫教授)
北 勝 利

暗所閾値電位 (scotopic threshold response, STR) の臨床応用は種々の夜盲性疾患や網脈絡膜ジストロフィーの主病変部位の検索や、病態生理の解明に有用であると期待された。ところがSTRの記録前には長時間 (約1時間) の暗順応を必要とし、さらに記録に長時間を要することや、STRは明順応により容易に抑制され再び記録可能になるまでに再度約1時間の暗順応を要することがその臨床応用に際し障壁となっていた。褪色光照射後の暗順応経過中の比較的早期に観察される陰性波はSTRに類似しており、もしこの陰性波がSTRそのものであれば、この記録方法を用いることによってSTRの臨床応用が容易になると期待された。この真偽を質す目的でネコを用いてSTRとこの陰性波の特徴を比較検討した。十分な暗順応後にb波の閾値 ($-4.8\log$) より2log弱い刺激光によりSTRが出現し始め、刺激光強度を強めるとb波が出現し始め次第にSTRは不明瞭になった。白色褪色光を5分間照射した後に暗順応を開始し、一定の刺激光強度 $-3.9\log$ でERG波形を記録すると暗順応開始後15分頃よりSTR類似の陰性波が出現し始めた。つぎに褪色光照射後に暗順応を開始し、25分の時点から刺激光強度を変化させてERGを記録すると $-4.8\log$ からSTR類似の陰性波が出現し、 $-3.9\log$ からはb波類似の陽性波が出現し始め、刺激光強度を増すに従いこの陽性波の振幅が増大したためにSTR類似の陰性波は不明瞭となった。つぎに褪色光照射後に記録された陰性波がSTRと同様に杆体作動性の応答であるか否かを検証した。青色または赤色刺激光を用いて刺激光強度を変化させてSTRおよび褪色光照射後に記録される陰性波を記録した。この結果から得た暗順応後に記録したSTRおよび褪色光照射後に記録した陰性波の振幅・刺激光強度曲線から基準電位5, 6, 7および8 μV でのSTR, および褪色光照射後に記録した陰性波の青色刺激光と赤色刺激光に対する閾値の対数の差を求めたところ、各基準電位でその差はほぼ一致した。暗順応後に記録されるSTRは杆体作動性の応答であるので、この結果から褪色光照射後に記録される陰性波は暗順応後に記録されるSTRと同様に杆体系応答であると推論された。 γ -アミノ-n-酪酸 (γ -amino-n-butyric acid, GABA) の硝子体内注入後には褪色光照射後に記録される陰性波は消失したが、暗順応開始後27分頃から出現し始めるb波類似の陽性波の振幅は注入前に比べ増大した。またGABAの硝子体内注入後には暗順応後に記録されるSTRは消失したが、b波の振幅は増大しa波にはほとんど影響を認めなかった。以上の結果から褪色光照射後の暗順応経過中の比較的早期に観察される陰性波はSTRそのものであると推論された。

Key words cat, electroretinogram, scotopic threshold response, bleaching

網膜電図 (electroretinogram, ERG) は網膜機能の他覚的検査法として種々の網膜疾患の診断や病態生理の解明の目的で臨床的に重用されている。暗所閾値電位 (scotopic threshold response, STR) は十分な暗順応後に暗順応絶対閾値近傍の弱い刺激光によって惹起される緩やかな角膜側陰性電位で、杆体系網膜内層由来のERGの新しい要素電位として近年同定された¹⁾。従来杆体系機能を評価する目的には暗所視b (scotopic b, b_s) 波を記録してきたが、STRの閾値は b_s 波の閾値より2log単位も低いことからSTRは b_s 波より杆体系機能評価のより純粋な指標となりうる。

STRは実は約30年前に既にカエル²⁾、ネコ³⁾、ヒツジ⁴⁾そしてヒト^{5) 6)}において記録されていた。ところがb波の閾値より低い微弱な刺激光によって惹起される角膜側陰性電位のSTRもまた特殊な条件下で記録されるa波であろうと誤って解釈された。さらに角膜側陰性電位であるa波の起始部下降脚はPⅢによって構成され、またPⅢは視細胞に由来することが当時既に

実証されていた^{7) 8)} ために、a波と同じく角膜側陰性電位であるSTRもまた視細胞由来であると誤って解釈されてきた。このようにSTRに関して正しく分析されなかった理由としてSTRの安定した記録が困難であったことが考えられる。

近年STRの記録のための種々の条件が整い、STRの安定した記録が可能となり、STRの発生源、発生機序および特性に関して詳細な研究がなされた^{1) 9) ~17)}。そこで種々の夜盲性疾患や網脈絡膜ジストロフィーの主病変部位の検索、および病態生理の解明のためにSTRの臨床応用は有用であると期待されている。ところが種々の記録条件が整った今日においてもSTRの記録には記録前の暗順応時間を含め長時間を要するために被験者にかなりの身体的かつ精神的負担を強いることとなり、このことが原因でSTRの臨床応用が困難であった。

褪色光照射後の暗順応経過中の比較的早期にSTR類似の陰性波が観察される。もしこの陰性波がSTRそのものであれば、この記録方法を用いることによってSTRの臨床応用が容易になる

平成12年10月27日受付, 平成13年1月9日受理

Abbreviations : b_s , scotopic b; ERG, electroretinogram; GABA, γ -amino-n-butyric acid; STR, scotopic threshold response

と期待される。本研究ではこの真偽を質す目的でネコを用いて STR とこの陰性波の特徴を比較検討した。

材料および方法

I. ネコの ERG 記録法

2匹のネコから ERG を記録した。ERG 記録時の全身麻酔は以下の通りである。硫酸アトロピン (田辺製薬, 大阪) 0.04mg/kg およびキシラジン (セラクター® 2% 注射液, Bayer AG, Leverkusen, Germany) 初回投与量 1mg/kg の筋肉内注射後, 塩酸ケタミン (ケタラル® 三共, 東京) 初回投与量 10mg/kg その後 5~10mg/kg/時間 およびキシラジン 0.5~1.0mg/kg/時間の筋肉内注射により麻酔を維持した。0.5% 塩酸フェニレフリンと 0.5% トロピカミド (ミドリン P®, 参天製薬, 大阪) および 1.0% 硫酸アトロピンの点眼により十分散瞳した後に双極型 Burian-Allen 角膜電極 (Hansen Ophthalmic Development Laboratory, Iowa, USA) を装着した。接地電極としてネコの背部皮下に針電極を刺入した。

II. 光刺激および ERG 記録装置

光刺激装置は全視野刺激用の積分球, 刺激光用と褪色光用の 2つのランプハウス, および遠隔制御装置より構成される (三双製作所, 東京)。積分球は直径 600mm で, 内面には拡散性白色塗装が施され, 直径 200mm の観察窓を有し, これにより全視野照射を得た。刺激光用ランプハウスにはコールドミラー付き 300W ハロゲンランプ (Quartzline® lamp, General Electric, Cleveland, USA) が内蔵され, 0 から 2.7log までの 9 ステップ (0, 0.3, 0.7, 1.0, 1.3, 1.7, 2.0, 2.3, 2.7) の中性フィルターの交換および電磁シャッターの開閉を明室に置いた制御装置によって遠隔操作した。電気刺激装置 SEN-3201 (日本光電, 東京) により電磁シャッターを開閉して, 刺激持続時間を 10 ミリ秒とし, 刺激間隔を 2 秒とした。最大刺激光 (0log) 強度は 300cd/m² であった。追加用中性フィルター挿入孔に 2 または 5log の中性フィルターを追加することによって, 7.7log の広域にわたり刺激光強度を変化させた。青色または赤色刺激光を得るには, 追加用中性フィルター挿入孔に青色フィルター (Kodak Wratten gelatin filter No.47B, Eastman Kodak, Rochester, USA) または赤色フィルター (Kodak Wratten gelatin filter No.29, Eastman Kodak) を挿入した。刺激光用と同じコールドミラー付き 300W ハロゲンランプ (General Electric) を内蔵したランプハウスを用いて褪色光を照射した。褪色光強度は 300cd/m² であった。

加算記録装置は 16 ビットパーソナルコンピュータ PC-9801RX (日本電気, 東京), アナログ/デジタル (A/D) 変換器, カラーディスプレイモニター N5913L (日本電気) および X-Y プロッタ MP3300 (グラフィテック, 東京) より構成された。ERG 波形およびそれを同期加算するためのトリガ信号を 16 チャンネル A/D 変換器の第 1 および第 2 チャンネルにそれぞれ入力した。この際 A/D 変換器の入力範囲 $\pm 5V$ を有効に利用するために, デジタル I/O を通してパーソナルコンピュータ PC-9801RX (日本電気) から利得を制御できるプログラマブル増幅器 MES-3102 (日本光電) を用いて, 得られた電位変化の最大振幅レベルを $\pm 5V$ 近くまで時定数 2 秒で増幅した。A/D 変換器で 12 ビットすなわち 0 から 4095 の数値となった ERG 波形データはパーソナルコンピュータ PC-9801RX (日本電気) に読み込まれ, トリガ信号が検出されると ERG 波形の採取が開始さ

れ, 記憶された。トリガ信号の検出には, まずトリガ信号の振幅を採取間隔約 50 μ 秒で連続して読み込んでおき, 現在採取している値と一つ前の値との差すなわち振幅の変化があらかじめ設定した値を越えた時初めてトリガ信号が到来したと判定するように設定した。このようにして 1 回の光刺激に対する ERG 波形がパーソナルコンピュータ PC-9801RX (日本電気) に記録された。同期加算によって雑音除去の効果を向上させるためにソフトウェアにアーティファクト除去処理をさせた。これには時間軸上の任意の区間に任意のウィンドウをあらかじめ設定し, ERG 波形が設定した一定の値の範囲に入らないときはアーティファクトと判定しそのデータを棄却した。その後次の光刺激に対する ERG 波形を同様に採取し, アーティファクトでないと判定されれば順次同期加算した。ウィンドウは 2 区間に別々に設定可能となるようにプログラムされたので, ERG のような複合波形の処理に適している。この処理によって不用意な眼球運動や瞬目の影響を除去することができる。アーティファクト除去と加算処理に約 0.1 秒を要するので, 加算の時間間隔として, 例えばデータの長さが 0.5 秒の時には約 0.6 秒が必要である。弱い刺激光のときは加算回数を 10 回とし強い刺激光のときは加算回数を 5 回から 1 回の範囲で変えた。所定の同期加算を終えた ERG 波形はカラーディスプレイモニター N5913L (日本電気) に表示され, X-Y プロッタ MP3300 (グラフィテック) によって印刷された。また ERG データはコメントを付けてフロッピーディスクに保存され, 随時読みだすことが可能である。プログラムの主要部分は Turbo Pascal で, 高速処理を要する部分は機械語で記述された。システムの初期設定やデータ採取, 印刷, データ処理などの各機能はカラーディスプレイモニター N5913L (日本電気) の画面上のメニューから選択可能であった。

III. γ -アミノ-n-酪酸 (γ -amino-n-butyric acid, GABA) の硝子体内注入方法

硝子体灌流液 (オベガード®-MA, 千寿製薬, 大阪) に溶解した 0.4M GABA (和光純薬, 大阪) 溶液 0.05ml (GABA 20 μ mol) を角膜輪部から 6mm 後方の強膜から硝子体内に刺入した 30 ゲージ注射針を用いて硝子体内に注入した。GABA を硝子体内に注入してから 90 分後に ERG の記録を開始した。

成 績

I. 十分な暗順応後に記録した STR

図 1 に 90 分の暗順応後に刺激光強度を $-7.3\log$ から $0\log$ まで変化させて記録した ERG を示す。ERG の最初の振れは強刺激光域 ($-2.1 \sim 0\log$) では陰性電位の a 波であり, 中間強度の刺激光 ($-3.4 \sim -2.4\log$) では陽性電位の b 波のみが記録された。b 波の閾値以下の弱刺激光域 ($-6.8 \sim -5.5\log$) では陰性電位の STR のみが記録された。STR の閾値は $-6.8\log$ であり, b 波の閾値 ($-4.8\log$) より $2\log$ 低かった。STR の振幅は $-4.8\log$ で最大値 14 μV を示した。STR は基線にもどるまでに約 300 ミリ秒を要した。STR の潜時は閾値近傍では約 70 ミリ秒であり, 刺激光強度を増すに従い次第に短縮し, b 波の閾値近傍の刺激光強度では約 55 ミリ秒であった。刺激光強度を $-4.8\log$ より強めると b 波が出現し始め, 次第に b 波の振幅が増大し $-3.9\log$ より強い刺激光では STR は不明瞭になった。

II. 褪色光照射後に時間の経過とともに記録された陰性電位

図 2 に 300cd/m² の白色褪色光を 5 分間照射した後に暗順応を開始し, 2.5~5 分毎に一定の刺激光強度 $-3.9\log$ で記録した

ERG波形を示す。暗順応開始後15分頃より潜時約70ミリ秒で基線にもどるまでに約300ミリ秒を要する緩やかな陰性波が出現し始め、暗順応が進むに従いこの陰性波の潜時は約55ミリ秒まで短縮しその振幅は増大した。27.5分頃から頂点潜時約90ミリ秒の陽性波が出現し始め、暗順応が進むに従いこの陽性波の振幅が増大したために先に記録された陰性波は不明瞭となった。この陽性波の頂点潜時は暗順応が進行しても変化しなかつ

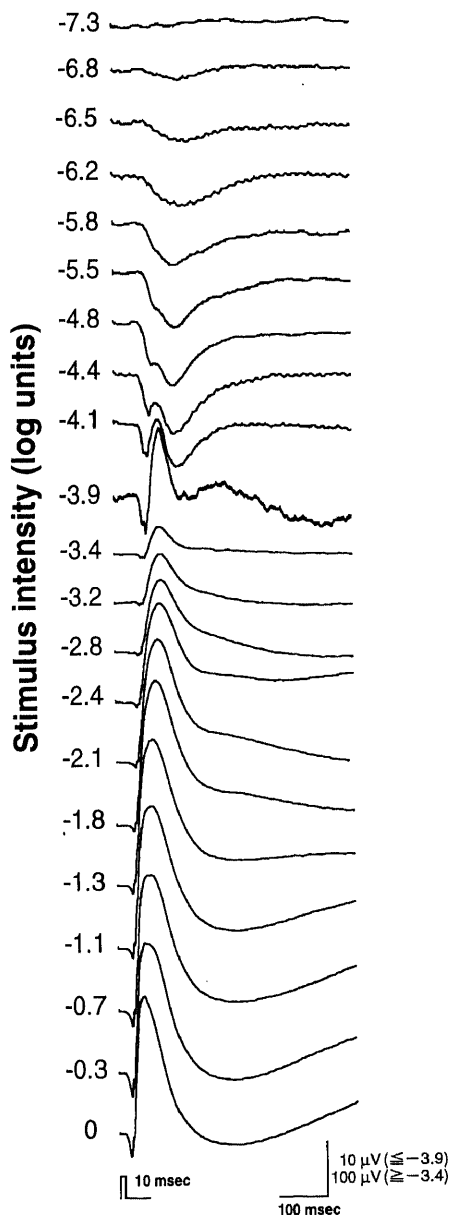


Fig. 1. The ERG intensity series recorded after a full dark adaptation for 90 min in a cat. The upward deflection indicates cornea-positive. The maximum stimulus intensity of full-field illumination was 300 cd/m^2 . The photic stimuli of 10-msec duration were repeated every 2 sec. The number of averaged responses was 10 at dim stimuli and decreased down to one at bright stimuli. The stimuli occurred at the beginning of trace, as shown by a stimulus marker at the bottom. These recording parameters also held in all other figures where ERG waveforms are shown.

た。60分間暗順応後には図1に示した90分間暗順応後に刺激光強度 $-3.9 \log$ で記録したERGとほぼ同様の波形が記録された。

Ⅲ. 褪色光照射後に刺激光強度を変化させて記録したERG

図3に 300 cd/m^2 の白色褪色光で5分間照射した後に暗順応を開始し、25分の時点から40秒毎に刺激光強度を $-5.5 \log$ から $-3.2 \log$ まで変化させて記録したERGを示す。 $-4.8 \log$ から潜時約70ミリ秒で基線にもどるまでに約300ミリ秒を要する緩

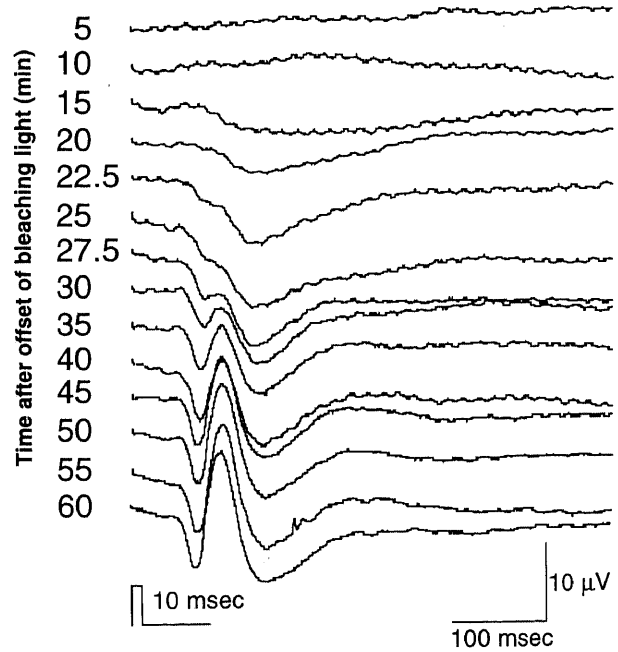


Fig. 2. The ERG responses to $-3.9 \log$ stimuli every 2.5 to 5 min after the offset of 5-min bleaching light.

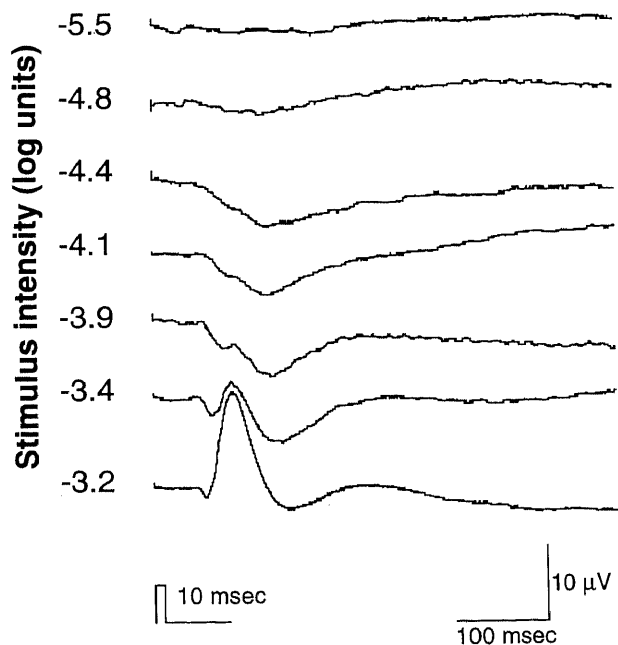


Fig. 3. The ERG intensity series recorded every 40 sec starting from 25 min after the offset of 5-min bleaching light.

やかな陰性波が出現し、刺激光強度を増すに従いこの陰性波の潜時は約55ミリ秒まで短縮し、その振幅は増大した。−3.9logからは頂点潜時約90ミリ秒の陽性波が出現し始め、刺激光強度を増すに従いこの陽性波の振幅が増大したために先に記録された陰性波は不明瞭となった。この陽性波の頂点潜時は刺激光強度を増してもほとんど変化しなかった。

Ⅳ. 青色または赤色刺激光を用いて記録したSTRおよび褪色光照射後に記録した陰性波

上記ⅡおよびⅢの褪色光照射後に記録された陰性波がSTRと同様に杆体作動性の応答であるか否かを検証する目的で以下の

実験を行なった。

1. 十分な暗順応後に青色または赤色刺激光を用いて記録したSTR

90分の暗順応後に強度−5.8logの白色刺激光を用いてSTRを記録し、次いで青色刺激光を用いて刺激光強度を−5.8logから−2.8logまで変化させてERGを記録した。再び強度−5.8logの白色刺激光を用いてSTRを記録し、その振幅を初めに−5.8logの白色刺激光を用いて記録したSTRの振幅と比較したところ、両者の振幅はほぼ同じであった。この結果からこの時点で網膜の順応状態に相違がないと考えた。この後に赤色刺

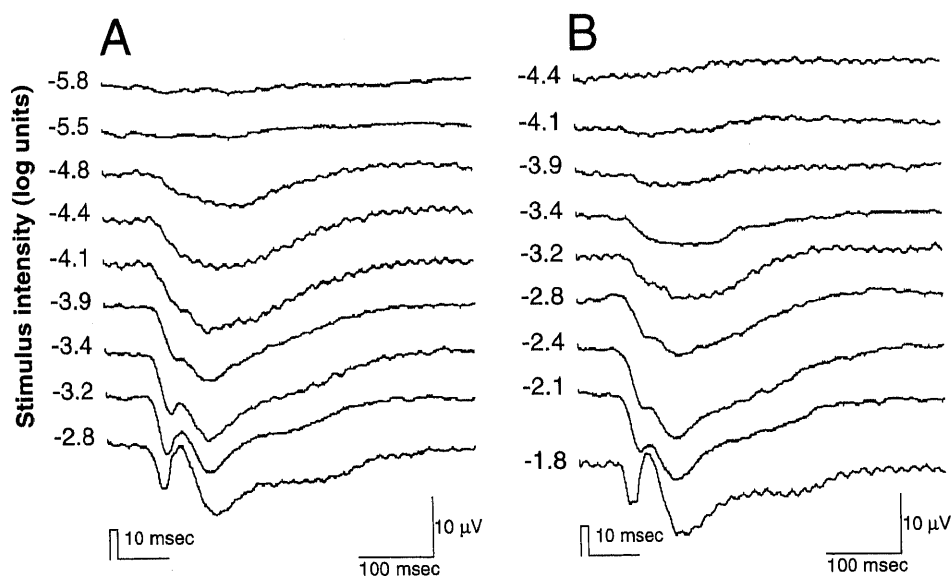


Fig. 4. The ERG intensity series recorded under fully dark-adapted condition in response to blue (Kodak wratten No. 47B) (A) and red (Kodak wratten No. 29) (B) stimuli.

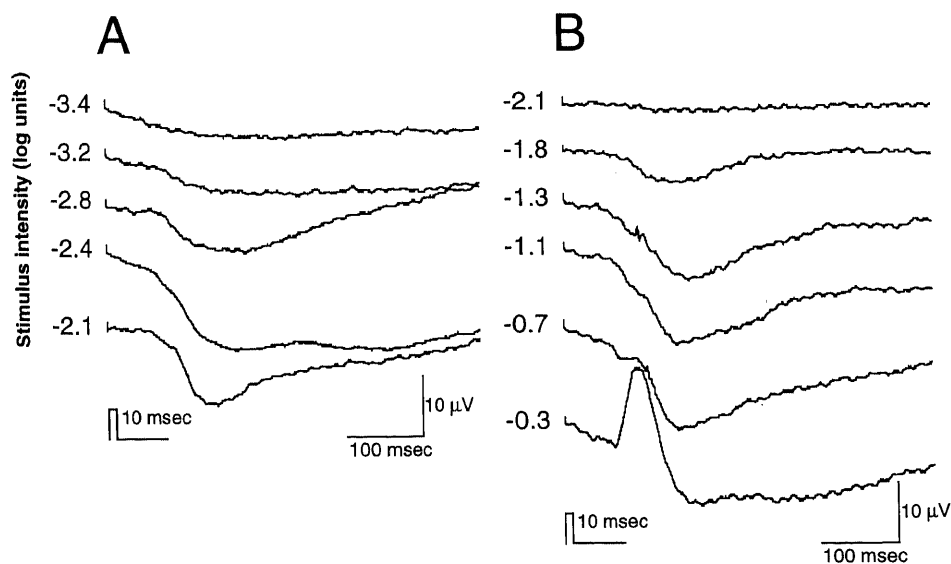


Fig. 5. The ERG intensity series recorded every 1 min starting from 22 min after the offset of 5-min bleaching light in response to blue (Kodak wratten No. 47B) (A) and red (Kodak wratten No. 29) (B) stimuli.

激光を用いて刺激光強度を $-4.4\log$ から $-1.8\log$ まで変化させてERGを記録した。図4に上記の方法で青色(図4A)または赤色刺激光(図4B)を用いて記録したERGを示す。青色刺激光(図4A)では $-4.8\log$ から、赤色刺激光(図4B)では $-3.9\log$ からSTRが出現し始め、刺激光強度を増すに従いその振幅は増大した。青色刺激光(図4A)では $-3.4\log$ から、赤色刺激光(図4B)では $-2.1\log$ からb波が出現し始め、さらに刺激光強度を増すに従いその振幅が増大したためにSTRは不明瞭となった。

2. 褪色光照射後に青色または赤色刺激光を用いて刺激光強度を変化させて記録したERG

室内光下に30分静置後、 $300\text{cd}/\text{m}^2$ の白色褪色光を5分間照射し、引き続き暗順応を開始して、20分の時点で網膜の順応状態の指標として強度 $-3.9\log$ の白色刺激光を用いて問題となっている陰性波を記録した。22分の時点から約1分毎に青色刺激光を用いて刺激光強度を $-3.4\log$ から $-2.1\log$ まで変化させてERGを記録した。赤色刺激光によるERGの記録を以下の如く

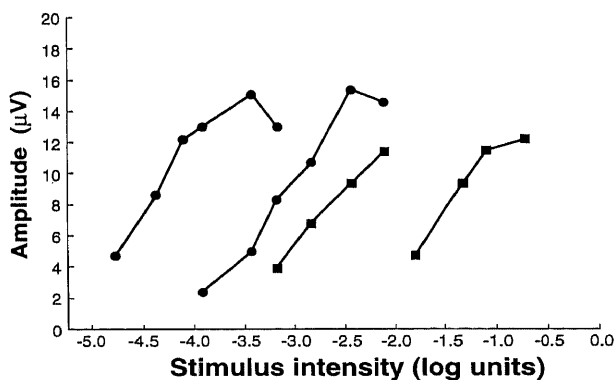


Fig. 6. Voltage-log intensity curves made from the data shown in Figures 4. and 5. The left and second left curves (●) pertain to the STR to blue and red stimuli, respectively. The second right and right curves (■) pertain to the cornea-negative response, which is shown in Fig. 5, to blue and red stimuli, respectively.

行なった。再び室内光下に30分静置後、 $300\text{cd}/\text{m}^2$ の白色褪色光を5分間照射し、その後に暗順応を開始し、20分の時点で網膜の順応状態の指標として強度 $-3.9\log$ の白色刺激光を用いて問題となっている陰性波を記録した。22分の時点から約1分毎に赤色刺激光を用いて刺激光強度を $-2.1\log$ から $-0.3\log$ まで変化させてERGを記録した。青色または赤色刺激光によるERGを記録する前に網膜の順応状態の指標として $-3.9\log$ の白色刺激光を用いて記録した問題となっている陰性波の振幅はほぼ同じであったので、青色刺激光を用いた場合と赤色刺激光を用いた場合とで網膜の順応状態に相違がないと考えた。図5に上記の方法で青色(図5A)または赤色刺激光(図5B)を用いて記録したERGを示す。青色刺激光(図5A)では $-3.2\log$ から、赤色刺激光(図5B)では $-1.8\log$ から問題となっている陰性波が出現し始め、刺激光強度を増すに従いその振幅は増大した。赤色刺激光(図5B)では $-0.7\log$ から陽性波が出現し始め、 $-0.3\log$ ではこの陽性波の振幅がかなり増大したために問題となっている陰性波は不明瞭となった。

3. STRおよび褪色光照射後に記録される陰性波の振幅・刺激光強度曲線

図6に図4および図5から得たデータをもとに作成した暗順応後に記録したSTR、および褪色光照射後に記録した陰性波の振幅・刺激光強度曲線を示す。4本の曲線は左から順に暗順応後に青色刺激光を用いて記録したSTR、暗順応後に赤色刺激光

Table 1. Difference between the thresholds to blue and red stimuli for the STR and the cornea-negative response

Criterion voltage (μV)	The difference (log units) for	
	STR	The cornea-negative response
5	1.30	1.28
6	1.28	1.26
7	1.25	1.25
8	1.24	1.20

The log difference was calculated from V-log I curves shown in Fig. 6.

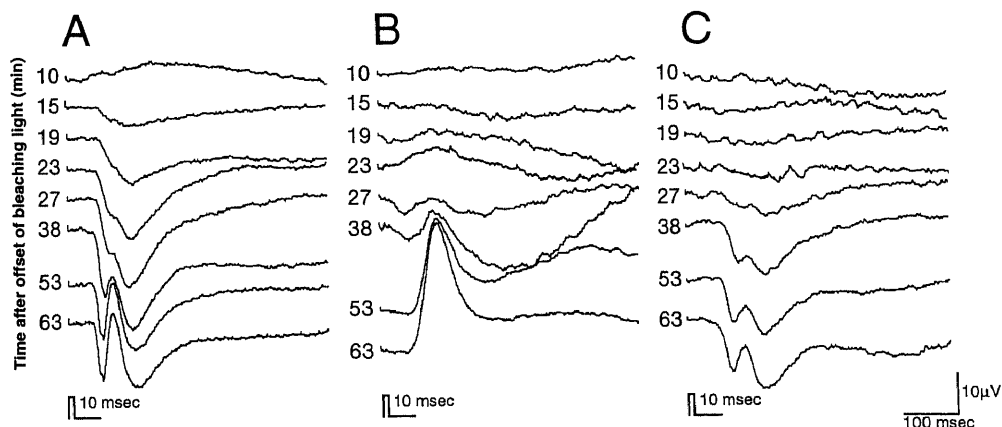


Fig. 7. The ERG responses to $-4.1\log$ stimuli every 4 to 15 min after the offset of 5-min bleaching light before (A), 90 min after (B) and 16 days after (C) an intravitreal injection of GABA.

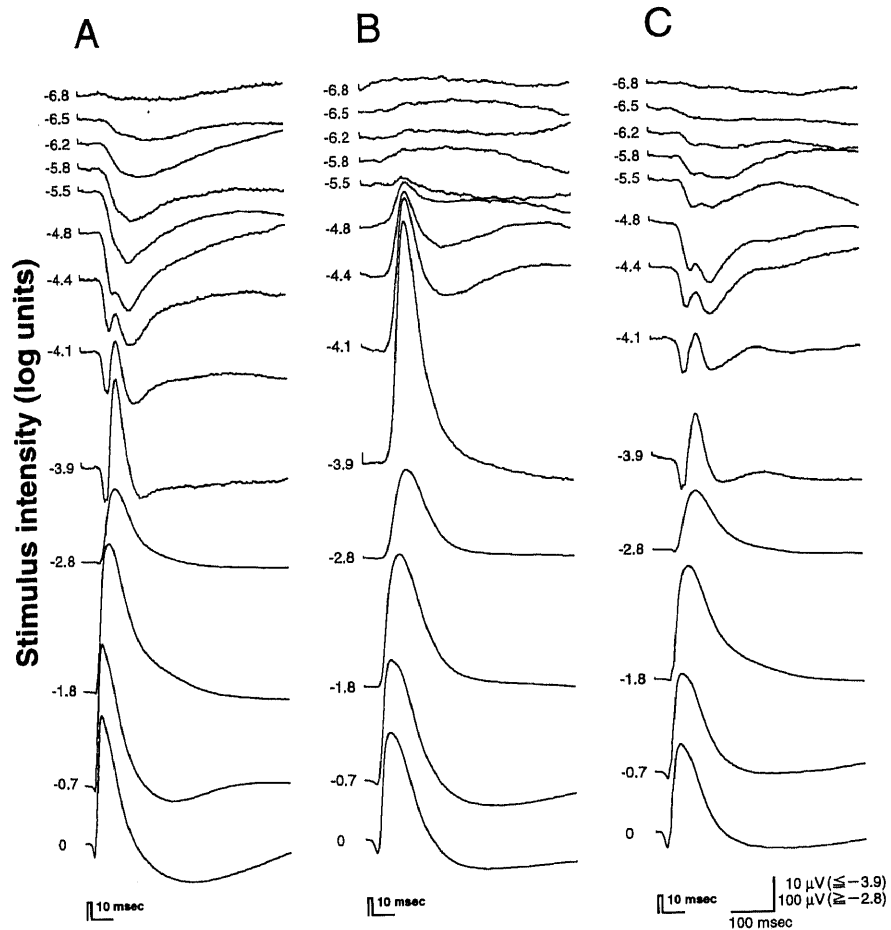


Fig. 8. The ERG intensity series recorded after a full dark adaptation for 90 min before (A), 90 min after (B) and 16 days after (C) an intravitreal injection of GABA.

を用いて記録したSTR, 褪色光照射後に青色刺激光を用いて記録した陰性波, 褪色光照射後に赤色刺激光を用いて記録した陰性波の振幅・刺激光強度曲線を示す。これら4本の振幅・刺激光強度曲線から基準電位5, 6, 7および8 μV での暗順応後に記録したSTR, および褪色光照射後に記録した陰性波の青色刺激光と赤色刺激光に対する閾値の対数の差を求めた(表1)。各基準電位での暗順応後に記録したSTR, および褪色光照射後に記録した陰性波の青色刺激光と赤色刺激光に対する閾値の対数の差はほぼ一致した。暗順応後に記録されるSTRは杆体作動性の応答である¹⁾ので, この結果から褪色光照射後に記録される陰性波は暗順応後に記録されるSTRと同様に杆体系応答であると推論される。

V. 褪色光照射後に記録される陰性波および暗順応後に記録されるSTRに対するGABAの影響

20 μmol のGABAを硝子体内に注入し, 室内光の下で90分静置した。硝子体注入後に網膜剥離および硝子体出血が生じないことを確認した。その後300cd/m²の白色褪色光を5分間照射した後に暗順応を開始し, 2.5~5分毎に強度-4.1logの白色刺激光でERGを記録した。ついで暗順応を90分まで継続した後に刺激光強度を-6.8logから0logまで変化させてERGを記録した。

1. 褪色光照射後に記録される陰性波に対するGABAの影響

20 μmol GABAの硝子体内注入前, 注入直後および注入16日後に室内光の下で90分静置した。引き続き300cd/m²の白色褪色光を5分間照射した後に暗順応を開始して, 2.5~5分毎に一定の強度-4.1logの白色刺激光でERGを記録した。図7に上記の方法で記録したERG波形を示す。GABA注入90分後(図7B)には褪色光照射後に記録される陰性波は消失した。またGABA注入90分後(図7B)では注入前(図7A)に比べ暗順応開始後27分頃から出現し始める陽性波の振幅は増大した。GABAの硝子体内注入から16日後(図7C)では褪色光照射後に記録される陰性波は再び記録可能となった。ただしGABAの硝子体内注入前(図7A)と比較してこの陰性波は約8分遅れて出現し始め, その振幅は減弱した。また27分頃から出現し始める陽性波の振幅もGABAの硝子体内注入前(図7A)と比較して減弱した。

2. 暗順応後に記録されるSTRに対するGABAの影響

図8に20 μmol GABAの硝子体内注入前(図8A), 注入90分後(図8B), および注入16日後(図8C)に90分の暗順応後に刺激光強度を-6.8logから0logまで変化させて記録したERG波形を示す。GABA注入90分後(図8B)には暗順応後に記録されるSTRは消失した。またGABA注入90分後(図8B)では注入前(図8A)に比べ刺激光強度-5.5logから-2.8logの範囲でb波振

幅は増大した。刺激光強度 $-0.7\log$ および $0\log$ で記録されるa波はGABAによる影響をほとんど受けなかった。GABAの硝子体内注入から16日後(図8C)では暗順応後に記録されるSTRは再び記録可能となった。ただしGABAの硝子体内注入前(図8A)と比較してGABA注入16日後(図8C)にはSTRの閾値は $0.3\log$ 上昇し、その振幅は減弱した。GABA注入16日後(図8C)ではb波に対するGABAの影響はほぼ消失した。

考 察

STRはSievingら¹⁾によりネコにおいてERGの新しい要素電位として近年同定されたが、実は約30年前に既に記録されていた。Gouras²⁾はカエルの摘出眼杯を用い閾値近傍の弱い局所刺激光により網膜表面から硝子体側陰性の波を記録した。さらに刺激光強度を上げてERGを記録し、その波形特性の観察からこの硝子体側陰性の波はa波であろうと考えた³⁾。Schweitzerら⁴⁾はヒトでコンピューターによる加算平均法を用い暗順応絶対閾値近傍で陰性波と陽性波から成る複合波形を記録したが、この陰性波の正体に関してはさらなる研究を要するとした。Ardenら³⁾は全身麻酔下のネコで硝子体を透明で非伝導性で高比重の油の一種に置換して微小電極を用い網膜表面から局所ERGを記録した。この方法では電位は増大されて記録されるため弱い刺激光により惹起される微弱な電位も記録可能になった。十分な暗順応下で刺激光強度を変化させて局所ERGを記録したところ、ヒトの暗順応絶対閾値よりごくわずかに明るい刺激光によって緩やかな陰性電位のみが記録され、刺激光強度を上げていくとb波およびa波が記録された。このERGを概観すると閾値近傍の弱い刺激光で惹起される陰性電位の起始部下降脚が、強い刺激光により惹起されるa波へと連続的に移行していくように見える。そこでArdenら³⁾は閾値近傍の弱い刺激光で惹起される緩やかな陰性電位はa波であると考えた。Finkelsteinら⁵⁾はヒトでBurian-Allen型角膜電極、積分球による全視野刺激光、およびERG応答のコンピューターによる加算平均法により、閾値近傍の微弱で緩やかな角膜側陰性電位を詳細な評価が可能な程度に正確に記録することに成功した。Finkelsteinら⁵⁾は記録したERGを概観した結果、閾値近傍の角膜側陰性電位の起始部下降脚はa波を形成するとの印象を述べた。Knaveら⁴⁾は全身麻酔下のヒツジから角膜電極、全視野刺激光およびERG応答のコンピューターによる加算平均法を用い、十分な暗順応下でb波閾値より $2.4\log$ 低い刺激光により緩やかな角膜側陰性電位を記録した。また明順応下で一時的に眼内圧を上昇させた後の早期に、a波およびb波が惹起されるほどに強い刺激光強度を用い緩やかな角膜側陰性電位を記録した⁴⁾。Knaveら⁴⁾はこの緩やかな角膜側陰性電位をそれぞれ杆体視細胞電位および錐体視細胞電位と考えた。このように先の研究者たちはSTRの記録を目的に応答対雑音比の向上などの種々の努力を重ねてきた。その結果STRの記録には成功したが、ERGにおけるSTRとa波の波形特性の分析のみからSTRはa波であると誤って解釈してしまった。Sievingら¹⁾は網膜内電位記録法を用いてSTRの網膜内発生起源について詳細に分析した結果、STRはa波とは明らかに発生起源を異にし、新しい要素電位であることを示した。STRは極めて微弱な電位であるためにその記録には低雑音の安定な増幅器とERG電位のコンピューターによる加算平均法を必要とし、またヒトでの臨床応用にはマイクロプロセッシングによるアーティファクト除去機能付き

ソフトウェアが不可欠である。さらにSTRの記録前には十分な(約1時間)暗順応を要すること、STRは明順応に弱く薄明かりによっても容易に消失するため記録室を暗黒に保つ必要があること、またb波の影響を可能なかぎり受けないように刺激光持続時間や刺激光強度を適切に設定する必要があることなど、STRの安定した記録には多くの適切な記録条件が整う必要があった。

近年STRの記録のための種々の条件が整いSTRの発生起源、発生機序および特性に関して動物、およびヒトで詳細な基礎研究^{1) 9) ~17)}がなされた結果、種々の夜盲性疾患や網脈絡膜ジストロフィーの主病変部位の検索や病態生理の解明のためにSTRの臨床応用は有用であると期待されている。ところがSTRの記録のための種々の条件が整った今日においてもSTRの記録には記録前の暗順応時間を含め長時間を要するため被験者にかなりの身体的かつ精神的負担を強いることとなり、このことがSTRの臨床応用を困難にする主因である。

十分な暗順応後に刺激光強度 $-3.9\log$ で記録したERGではb波の台頭によりSTRは不明瞭であった(図1)。白色褪色光を照射後の暗順応経過中の比較的早期に、この刺激光強度 $-3.9\log$ で最初に記録されるネコのERGは緩やかな陰性波であった(図2)。この陰性波は潜時約70ミリ秒で基線にもどるまでに約300ミリ秒を要した(図2)。この陰性波はその潜時および波形に関して、十分な暗順応後に閾値近傍の刺激光強度で記録したSTRの波形($-6.8\log$, 図1)に類似している。図1において刺激光強度を $-3.9\log$ から順次弱めていくとb波振幅が徐々に減弱しSTRのみが記録されるようになることから、刺激光強度 $-3.9\log$ で記録したERG波形の最初の陰性の振れはSTRであると考えられる。図2の60分間暗順応後に記録したERGは図1の刺激光強度 $-3.9\log$ で記録したERGとはほぼ同様の波形であり、よって60分間暗順応後に記録したERG波形の最初の陰性の振れはSTRであり、この陰性の振れに続く陽性の振れはb波であると考えられる。図2において暗順応時間を60分から逆のぼってERG波形をみていくと、b波と考えられる陽性波の振幅は徐々に減弱し、STRであると考えられる陰性の振れと連続する陰性波のみが記録されるようになる。よって図2における最初に記録される緩やかな陰性波はSTRである可能性が高い。すなわち 300cd/m^2 の白色褪色光を5分間照射した後に暗順応を開始し、一定の刺激光強度 $-3.9\log$ でERGを記録した時に、暗順応開始後15分頃より出現し始める緩やかな陰性波はSTRである可能性が高い。この陰性波の特性をさらに詳しく調べるために褪色光照射後の暗順応経過中の比較的早期に刺激光強度を変化させて記録したERG(図3)では刺激光強度を順次強めていくと最初に記録されるERGは潜時約70ミリ秒の緩やかな陰性波であり、この陰性波はその潜時および波形に関して、十分な暗順応後に閾値近傍の刺激光強度で記録したSTRの波形に類似している。刺激光強度を増すに従いこの陰性波の潜時は短縮し、その振幅は増大し、さらに刺激光強度を増すと図2に関する上記の考察からb波と考えられる陽性波が出現し始め、問題となっている陰性波は不明瞭となった。すなわちこの陰性波の閾値はb波の閾値よりも低く、この陰性波とb波の閾値の関係は、十分な暗順応後に刺激光強度を変化させて記録したERG(図1)におけるSTRとb波の閾値の关系到類似している。この点からも問題となっている陰性波がSTRである可能性は高い。

Sievingら¹⁾はネコのSTRが杆体系応答であることを以下の2

点から証明した。第1にSTRの閾値が最も感度の高い神経節細胞の応答の閾値と近似していること、第2に杆体等価となるような強度に選んだ青色と赤色の刺激光を用いてSTRを惹起すると少なくとも3.0 log単位の刺激光域でSTRの波形と振幅が青色と赤色の刺激光で同じことである。ネコのみでなくサル¹⁵⁾およびヒト⁹⁾においてもSTRが杆体系応答であることはすでに証明されている。そこで問題となっている陰性波が杆体系応答であるか否かを検証した。青色または赤色刺激光を用いてERGを記録した実験の結果(図4, 5, 6および表1)から、問題となっている陰性波は暗順応後に記録されるSTRと同じ杆体系応答であると推論された。この結果からも問題となっている陰性波がSTRそのものである可能性は高い。

STRの発生起源に関する研究としては以下の報告がある。Sievingら¹¹⁾は微小電極を用いた網膜内電位記録法によってネコのSTRの網膜内での発生部位が網膜近位側であることを明らかにした。Wakabayashiら¹⁰⁾はネコおよびサルにおいて硝子体内にアスパラギン酸ナトリウムを注入し、視細胞より内層に発生起源を有するERG成分を消去した状態においてはSTRが記録されないことから、ネコおよびサルのSTRが視細胞由来のa波と異なり視細胞より内層に発生起源を有することを実証した。Frishmanら¹²⁾は網膜近位側で光刺激により惹起される細胞外K⁺濃度の増加およびSTRを同時に記録し、以下の結果を得た。刺激光強度を変化させたときの細胞外K⁺濃度の増加およびSTRの動態、さらに両者の応答の時間経過は閾値から飽和強度まで極めて類似した。Sieving¹⁴⁾は長期間経過した視神経萎縮の患者の眼および視神経を切断後に視神経節細胞が変性消失したネコの眼においてもSTRが記録されることから、視神経節細胞はSTRの発生に関与していないと考えた。Frishmanら¹⁷⁾は長期間の高眼圧により高度の視野欠損および視神経節細胞の消失をきたしたサル眼ではSTRが減弱あるいは消失すること、およびSieving¹⁴⁾の報告の中の視神経節細胞が変性消失した後に記録されたヒトおよびネコのSTRの時間経過が視神経節細胞の変性消失前と比較して短くなっていることから、STRの発生には視神経節細胞も関与しており、その関与の程度は種によって異なるのではないかと述べている。Naarendorpら¹³⁾は主に網膜内層の神経細胞に作用することが判明しているGABA^{18)~26)}をネコの硝子体内に注入することによりb波およびa波にはほとんど影響を与えずにSTRを消失させることに成功した。この実験結果からSTRの発生起源はb波あるいはa波の発生起源と明らかに異なっていることが判明した。そこで本研究において褪色光照射後に記録される陰性波および暗順応後に記録されるSTRに対するGABAの影響を調べた実験の結果(図7, 8)から、褪色光照射後に記録される陰性波は暗順応後に記録されるSTRと同様にGABAの硝子体内注入により選択的に抑制されることが明らかとなった。したがって褪色光照射後に記録される陰性波の発生起源は暗順応後に記録されるSTRの発生起源と同じであると推論される。

本研究結果をすべて考え合わせると、褪色光照射後の暗順応経過中の比較的早期に記録される陰性波はSTRそのものであり、本報で確立したSTRの新しい記録方法を用いることにより短時間でSTR記録を終えることが可能となり、被験者に対する身体的かつ精神的負担も最小限におさえられる。すなわち、種々の夜盲性疾患や網脈絡膜ジストロフィーの主病変部位の探索や病態生理の解明のために有用であると期待されているSTR

の臨床応用を従来より容易にすることが可能となる。

結 論

ネコにおいて褪色光照射後の暗順応経過中の比較的早期に観察される陰性波とSTRの特徴を比較検討し、以下の結果を得た。

1. 90分の暗順応後に刺激光強度を $-7.3\log$ から $0\log$ まで変化させてERGを記録すると、b波の閾値以下の弱刺激光域($-6.8\sim-5.5\log$)では陰性電位のSTRのみが記録された。STRは基線にもどるまでに約300ミリ秒を要した。STRの潜時は閾値近傍では約70ミリ秒であり、刺激光強度を増すに従い次第に短縮し、b波の閾値近傍の刺激光強度では約55ミリ秒であった。刺激光強度を $-4.8\log$ より強めるとb波が出現した。
2. 300cd/m^2 の白色褪色光を5分間照射した後に暗順応を開始し、2.5~5分毎に一定の刺激光強度 $-3.9\log$ でERGを記録すると、暗順応開始後15分頃より緩やかな陰性波が出現し始め、暗順応が進むに従いこの陰性波の潜時は短縮し、その振幅は増大した。この陰性波はその潜時および波形に関して、STRに類似した。27.5分頃からb波と考えられる陽性波が出現した。
3. 300cd/m^2 の白色褪色光で5分間照射した後に暗順応を開始し、25分の時点から刺激光強度を $-5.5\log$ から $-3.2\log$ まで変化させてERGを記録すると、 $-4.8\log$ から緩やかな陰性波が出現した。この陰性波はその潜時および波形に関して、閾値近傍の刺激光強度で記録したSTRの波形に類似した。刺激光強度を増すに従いこの陰性波の潜時は短縮し、その振幅は増大した。 $-3.9\log$ からはb波と考えられる陽性波が出現した。すなわちこの陰性波の閾値はb波の閾値よりも低く、この陰性波とb波の閾値の関係は、STRとb波の閾値の関係に類似した。
4. 青色刺激光および赤色刺激光に対する閾値の対数の差はSTRおよび褪色光照射後に記録される陰性波とはほぼ一致した。STRは杆体作動性の応答であるので、この結果から褪色光照射後に記録される陰性波はSTRと同様に杆体系応答であると推論された。
5. GABAの硝子体内注入後には褪色光照射後に記録される陰性波は消失したが、暗順応開始後27分頃から出現し始めるb波と考えられる陽性波の振幅は注入前に比べ増大した。またGABAの硝子体内注入後には90分の暗順応後に記録されるSTRは消失したが、b波の振幅は増大しa波はほとんど変化しなかった。したがって褪色光照射後に記録される陰性波はSTRと同じくGABAによって消去された。
6. 以上の結果から、褪色光照射後の暗順応経過中の比較的早期に記録される陰性波はSTRそのものであることが判明した。本報で確立したSTRの新しい記録方法はSTR記録の時間を著しく短縮し、STRの臨床応用を促進すると期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部眼科学講座河崎一夫教授に深甚の謝意を捧げます。また本研究の遂行にあたり、御指導と御協力を賜りました白尾 裕助教授、若林謙二博士、田村敏博博士、齋藤友護学士、田川考作学士、宮下洋光学士、長谷川敦俊学士に深謝致します。

本研究の要旨は第43回日本臨床視覚電気生理学会(1995, 奈良), The Association for Research in Vision and Ophthalmology (1996, フォート・ローダゲール, 米国), International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (1996, チュービンゲン, ドイツ)において発

表した。

文 献

- 1) Sieving PA, Frishman LJ, Steinberg RH. Scotopic threshold response of proximal retina in cat. *J Neurophysiol* 56: 1049-1061, 1986
- 2) Gouras P. Electrical activity of toad retina. *Am J Ophthalmol* 46: 59-72, 1958
- 3) Arden GB, Brown KT. Some properties of components of the cat electroretinogram revealed by local recordings under oil. *J Physiol* 176: 429-461, 1965
- 4) Knave B, Moller A, Persson HE. A component analysis of the electroretinogram. *Vision Res* 12: 1669-1684, 1972
- 5) Schweitzer NMJ, Troelstra A. A negative component in the b-wave of the human ERG. *Ophthalmologica* 149: 230-235, 1965
- 6) Finkelstein D, Gouras P, Hoff M. Human electroretinogram near the absolute threshold of vision. *Invest Ophthalmol* 7: 214-218, 1968
- 7) Brown KT, Wiesel TN. Localization of origins of electroretinogram components by intraretinal recording in the intact cat eye. *J Physiol* 158: 257-280, 1961
- 8) Brown KT, Watanabe K. Isolation and identification of a receptor potential from the pure cone fovea of the monkey retina. *Nature* 193: 958-960, 1962
- 9) Sieving PA, Nino C. Scotopic threshold response (STR) of the human electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1608-1614, 1988
- 10) Wakabayashi K, Gieser J, Sieving PA. Aspartate separation of the scotopic threshold response (STR) from the photoreceptor a-wave of the cat and monkey ERG. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1615-1622, 1988
- 11) Frishman LJ, Steinberg RH. Intraretinal analysis of the threshold dark-adapted ERG of cat retina. *J Neurophysiol* 61: 1221-1232, 1989
- 12) Frishman LJ, Steinberg RH. Light-evoked increases in $[K^+]_o$ in proximal portion of the dark-adapted cat retina. *J Neurophysiol* 61: 1233-1243, 1989
- 13) Naarendorp F, Sieving PA. The scotopic threshold response of the cat ERG is suppressed selectively by GABA and glycine. *Vision Res* 31: 1-15, 1991
- 14) Sieving PA. Retinal ganglion cell loss does not abolish the scotopic threshold response (STR) of the cat and the human

ERG. *Clin Vision Sci* 6: 149-158, 1991

- 15) Sieving PA, Wakabayashi K. Comparison of rod threshold ERG from monkey, cat and human. *Clin Vision Sci* 6: 171-179, 1991
- 16) Frishman LJ, Sieving PA. Evidence for two sites of adaptation affecting the dark-adapted ERG of cats and primates. *Vision Res* 35: 435-442, 1995
- 17) Frishman LJ, Shen FF, Du L, Robson JG, Harwerth RS, Smith III EL, Carter-Dawson L, Crawford MLJ. The scotopic electroretinogram of macaque after retinal ganglion cell loss from experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 125-141, 1996
- 18) Yonemura D, Kawasaki K, Yanagida T, Tanabe J, Kawaguchi H, Nakata Y. Effects of Ω -amino acids on oscillatory activities of the light-evoked potentials in the retina and visual pathways. *Proc 16th ISCEV Symp, Jpn J Ophthalmol Suppl*: 339-353, 1979
- 19) Miller RF, Dacheux RF, Frumkes TE. Amacrine cells in necturus retina: evidence for independent γ -aminobutyric acid- and glycine-releasing neurons. *Science* 198: 748-750, 1977
- 20) Wachtmeister L, Dowling JE. The oscillatory potentials of the mudpuppy retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 1176-1188, 1978
- 21) Wachtmeister L. Further studies of the chemical sensitivity of the oscillatory potentials of the electroretinogram (ERG). *Acta Ophthalmol* 58: 712-725, 1980
- 22) Miller RF, Frumkes TE, Slaughter M, Dacheux RF. Physiological and pharmacological basis of GABA and glycine action on neurons of mudpuppy retina. II. Amacrine and ganglion cells. *J Neurophysiol* 45: 764-782, 1981
- 23) Dick E, Miller RF. Extracellular K^+ activity changes related to electroretinogram components. I. Amphibian (I-type) retinas. *J Gen Physiol* 85: 885-909, 1985
- 24) Dick E, Miller RF, Bloomfield S. Extracellular K^+ activity changes related to electroretinogram components. II. Rabbit (E-type) retinas. *J Gen Physiol* 85: 911-931, 1985
- 25) Bolz J, Frumkes T, Voigt T, Wässle H. Action and localization of γ -aminobutyric acid in the cat retina. *J Physiol* 362: 369-393, 1985
- 26) Gottlob I, Wünsch L, Tuppy FK. The rabbit electroretinogram : Effect of GABA and its antagonists. *Vision Res* 28: 203-210, 1988

A Novel Method of Recording the Scotopic Threshold Response Katsutoshi Kita, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 Kanazawa — J. Jusen Med Soc., **110**, 31 — 40 (2001)

Key words cat, electroretinogram, scotopic threshold response, bleaching

Abstract

Clinical application of the scotopic threshold response (STR) of an electroretinogram (ERG) has been greatly anticipated as useful in the evaluation of the main affected sites in nyctalopia and chorioretinal dystrophies, and in the elucidation of their pathophysiology. To record the STR, however, takes a long time because a full dark adaptation is required to testing, which makes the STR less accessible in clinics. A cornea-negative response, which is elicited at relatively early stage during dark adaptation after bleaching light, is similar in waveform to the STR. If this response is truly the STR, clinical application of the STR would then become practical. To examine this possibility in detail, the characteristics of this response were compared with those of the STR in cats. In a fully dark-adapted condition, the STR appeared at a -6.8 log stimulus, which is dimmer than the threshold of the b-wave by 2.0 log units. As stimulus intensity increased, the b-wave appeared, became larger and eventually obscured the STR. Fifteen min after the offset of the 5-min bleaching light, a cornea-negative response similar in waveform to the STR was evoked by a -3.9 log stimulus. Recordings of the ERG intensity series starting 25 min after the offset from the bleaching light first revealed a cornea-negative response similar to the STR at a -4.8 log stimulus, and then increasing the stimulus intensity evoked the b-wave, which became larger and eventually replaced the cornea-negative response. From voltage-intensity curves of the STR and the cornea-negative response, each in response to red and blue stimuli, the log difference between the thresholds to red and blue stimuli for both responses was calculated at criterion voltages of 5, 6, 7 and 8 μ V. The log difference of the cornea-negative response was nearly equal to that of the STR. Therefore, this cornea-negative response is presumably rod-driven as the STR is. After an intravitreal injection of γ -amino-n-butyric acid (GABA), the STR and the cornea-negative response under study were simultaneously abolished, a larger b-wave appeared and the a-wave was not affected. These results indicate that this cornea-negative response, which is elicited at a relatively early stage during dark adaptation after bleaching, is truly the STR. The present study provides a new, convenient method of recording the STR, which has previously been very time-consuming and thus difficult in clinical use.